吡虫啉大田使用剂量对意大利蜜蜂工蜂学习和记忆的影响

蔚添添，和静芳，罗婷婷，董应波，李志国*，苏松坤

（福建农林大学蜂学学院，福州 350002）

摘要：【目的】吡虫啉(imidaclorprid)是新烟碱类农药中使用最为广泛的农药种类，作用于蜜蜂脑部的烟碱型乙酰胆碱受体，此外，吡虫啉对蜜蜂生长发育有一定影响。本研究旨在明确吡虫啉大田使用剂量对蜜蜂学习、记忆行为的影响，为探明部分地区蜂群大面积死亡原因提供佐证，也可为该药田间安全使用提供参考。【方法】用油漆笔标记刚出房的 1 日龄意大利蜜蜂 *Apis mellifera ligustica* 工蜂，置于蜂群中 8 d 后取出，在室内恒温恒湿箱(30 ± 1℃，相对湿度为 40% ± 10%，黑暗)中笼养 9 d(每盒 50 头)，处理组自由采集含 0.01 ng/μL 吡虫啉的 30%(w/v)糖水，对照组自由采集含 0.01 ng/μL 丙酮的 30%(w/v)糖水。使用自制的蜜蜂气味学习设备，在 3 次配对的柠檬气味刺激和糖水刺激训练基础上，对 18 日龄蜜蜂进行气味联想性学习和记忆实验 。【结果】处理组和对照组蜜蜂在为期 9 d 的饲喂过程中的死亡率无显著差异($P > 0.05$)。在 3 次气味联想性学习实验中，与对照组相比，处理组蜜蜂在第 2 和第 3 次实验中学习能力显著降低($P < 0.01$)，而在第 1 次实验中无差异〔喙伸反应率(PER)% = 0〕；24 h 后，处理组蜜蜂的喙伸反应率与对照组无显著差异($P > 0.05$)。【结论】结果表明，0.01 ng/μL 吡虫啉不会导致蜜蜂急性死亡；在此剂量吡虫啉作用下，蜜蜂的 24 h 长期记忆虽不受影响，但学习能力显著受到抑制，进而可能对蜜蜂的采集行为等产生不利影响。

关键词：意大利蜜蜂；新烟碱类农药；吡虫啉；环境剂量；学习行为；记忆行为；伸吻反应

中图分类号：Q965.9 **文献标识码**：A **文章编号**：0454-6296(2017)11-1300-07

Effects of field realistic doses of imidacloprid on learning and memory of *Apis mellifera ligustica* (Hymenoptera: Apidae) workers

YU Tian-Tian, HE Jing-Fang, LUO Ting-Ting, DONG Ying-Bo, LI Zhi-Guo*, SU Song-Kun (College of Bee Sciences, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: 【Aim】 Imidaclorprid is the most widely used pesticide among neonicotinoid pesticides and acts on the brain's nicotinic acetylcholine receptor of honey bees. In addition, imidaclorprid interferes with the growth and development of honey bees. This study aims to clarify the effects of imidacloprid at field realistic doses on learning and memory of honey bees, so as to provide evidence for the prediction of the widespread death of colonies in some areas and reference for the safe use of neonicotinoid pesticide in the field. 【Methods】 Newly emerged 1-day-old bees (*Apis mellifera ligustica*) were marked by paint marker. They were kept in the colony for 8 d, and then were reared within boxes (50 individuals/box) in an incubator with constant temperature and humidity (30 ± 1℃, relative humidity 40% ± 10%, dark) for 9 d. Meanwhile, the treatment group fed 30% (w/v) syrup containing 0.01 ng/μL of imidacloprid

基金项目：国家现代农业产业技术体系(蜜蜂)项目(CARS-45-KXJ3)；福建省自然科学基金项目(2016J05063)
作者简介：蔚添添，女，1993 年 10 月生，山西吕梁人，硕士研究生，研究方向为蜜蜂科学，E-mail：18235444603@163.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: zhiguo.li@fafu.edu.cn
收稿日期 Received：2017-07-14；接受日期 Accepted：2017-10-19

ad libitum, while the control group fed 30% (w/v) syrup containing 0.01 ng/μL of acetone *ad libitum*. Following being trained with three paired stimulations (lemon odor paired with sucrose stimulation) performed using a customized device, the 18-day-old bees were used for the olfactory associative learning and memory experiments. 【Results】There was no significant difference in the mortality between the treatment group and the control group during the 9-day feeding period ($P>0.05$). In the three olfactory associative learning experiments, the learning ability of bees of the treatment group in the 2nd and 3rd experiments was significantly reduced ($P<0.01$) compared with the control group, but there was no difference in the 1st experiment [proboscis extension response (PER)% =0]. After 24 h, the proboscis extension reflex rate was not significantly different between the treatment and control groups ($P>0.05$). 【Conclusion】The results demonstrate that 0.01 ng/μL imidacloprid does not cause acute death of honey bees. This dose of imidacloprid does not affect the 24 h long-term memory of honey bees, but impairs learning ability of honey bees significantly and may even adversely affect the foraging behavior of honey bees.

Key words: *Apis mellifera ligustica*; neonicotinoid pesticides; imidacloprid; field realistic dose; learning behaviors; memory behaviors; proboscis extension response

蜜蜂是农作物的主要授粉者,在自然生态系统中扮演重要角色。在全球众多的授粉昆虫中,蜜蜂数量约占总量的80%(卜元卿等, 2009)。欧洲约有264种作物依赖授粉服务来完成自身的有性繁殖(Klein *et al*., 2007),北美有100多种经济作物需要授粉服务(Morse and Calderone, 2000; Klein *et al*., 2007)。2006年,美国首次发生越冬蜜蜂突然大量减少现象(Vanengelsdorp *et al*., 2007),随后其他国家也出现类似状况(Cox-Foster *et al*., 2007; Oldroyd, 2007; Neumann and Carreck, 2010)。然而,有关蜂群骤减原因众说纷纭,颇多研究者认为是由多种因素协同作用引起。其中,新烟碱类(neonicotinoid)农药的大范围使用与蜜蜂减少关系密切(Girolami *et al*., 2009; Mullin *et al*., 2010; Lu *et al*., 2012)。一方面,蜜蜂体内有限的解毒蛋白基因增加蜜蜂对新烟碱类农药的敏感性(Claudianos *et al*., 2006);另一方面,新烟碱类农药抑制细胞色素P450解毒酶活性(Iwasa *et al*., 2004),与病原体长期联合胁迫削弱蜜蜂免疫(Vidau *et al*., 2011; Pettis *et al*., 2012),使蜜蜂易感病,对低温敏感,进而引发蜂群崩溃综合症(colony collapse disorder, CCD),严重影响蜜蜂授粉服务。

吡虫啉(imidacloprid)作为新烟碱类农药中使用最为广泛的农药种类,是典型的系统性神经毒剂,应用方式主要有种子包衣、土壤浸湿和叶面喷施,在靶向农业害虫的同时,也影响蜜蜂等非靶标生物。吡虫啉是硝基取代化合物,相较于氰基取代类,对蜜蜂毒性更甚(Iwasa *et al*., 2004),且代谢产物5-羟基吡虫啉,4,5-二羟基吡虫啉等对蜜蜂有代谢毒性,甚至高于吡虫啉毒性,两者均与蜜蜂脑部的蕈形体(mushroom bodies, MBs)和触角叶(antennal lobes, ALs)中的烟碱型乙酰胆碱受体(nicotinic acetylcholine receptor, nAChRs)有高度亲和力(Matsuda *et al*., 2001; Suchail *et al*., 2004; Belzunces *et al*., 2012)。蜜蜂在农业生产、社会经济和社会行为研究中发挥重要价值,许多半田间实验或实验室研究已经证明,吡虫啉对成年蜂48 h急性毒性$LD_{50}=3\sim81$ ng/蜂(Suchail *et al*., 2000, 2001; Schmuck *et al*., 2001; Decourtye and Devillers, 2010; Guez, 2013),而田间开花作物中吡虫啉残留远低于致死毒性,但仍对蜂群性能产生不利的亚致死效应:降低蜂王繁殖力(Wu-Smart and Spivak, 2016);削弱蜂群,对疾病易感(Vidau *et al*., 2011; van der Sluijs *et al*., 2013);影响卵和幼虫发育(Yang *et al*., 2012; van der Sluijs *et al*., 2013);损害蜜蜂认知行为,包括定位、导航能力、嗅觉学习、记忆、跳舞等行为(Nauen *et al*., 1998; Belzunces *et al*., 2012; Farooqui, 2013)。

与急性毒性相比,吡虫啉亚致死剂量及其代谢物对蜜蜂健康的影响更符合农药生态毒性评估要求。近年来,吡虫啉亚致死剂量对蜜蜂学习、记忆行为的影响成为研究热点。Decourtye等(2004)在户外飞行笼中提供意蜂含24 μg/kg吡虫啉的糖水,发现对蜜蜂的学习能力产生消极影响;代平礼等(2013)表明单次接触0.15和0.65 ng/蜂剂量吡虫啉同样降低学习能力;最近,Yang等(2012)表明

0.04 ng/幼虫不影响羽化率,但却使发育为成年蜂后嗅觉学习能力受损。此外,Schmuck(2004)研究发现0.1, 1 和 10 ng/μL 的吡虫啉代谢物引起蜜蜂死亡,与之前 Suchail 等(2001)研究结果高度矛盾,猜测可能是由实验蜜蜂日龄不同所致,日龄影响蜜蜂采集行为,且日龄较大的工蜂对化学药剂更加敏感。可见,蜜蜂学习、记忆行为除受吡虫啉浓度影响外,还与实验采用方法、蜜蜂日龄、接触农药的个体生理阶段有关。而很多学者在研究吡虫啉的剂量效应时,忽视了蜜蜂日龄这一重要的非特异性因子。

本研究的目标主要聚焦在吡虫啉大田使用剂量对同一日龄意大利蜜蜂学习与记忆行为的影响。在现实环境中,对于一些花期较长的开花作物,例如油菜花、胡豆和豌豆等,蜜蜂往往会反复采集花蜜。所以,在本研究中,我们选取同日龄出房的工蜂,用油漆笔进行标记,将带有颜色标记的工蜂放入蜂群中饲养 8 d 后,用软镊子取回标记蜜蜂(50 头/盒),在室内恒温恒湿箱中(30 ± 1℃,相对湿度为 40% ± 10%,黑暗)持续 9 d 允许蜜蜂自由采集含 0.01 ng/μL 吡虫啉的 30% 糖水(w/v),利用 18 d 的同日龄蜜蜂进行气味联想性的学习与记忆行为测定,以求探明田间剂量吡虫啉对蜜蜂学习和 24 h 记忆行为的影响,特别要探明蜂龄所起的作用。结果可为吡虫啉在农业生产中的安全应用提供参考,也为破解近年来一些地方蜂群突然消失提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试蜜蜂

本实验使用的意大利蜜蜂 *Apis mellifera ligustica* 取自福建农林大学蜂学学院实验蜂场,实验全程在福建农林大学校园(隶属亚热带季风气候,东经 119°30′,北纬 26°08′,海拔 600 ~ 1 000 m)进行。调查发现校园中无吡虫啉使用痕迹。

1.2 环境剂量吡虫啉的确定

参考 Chauzat 等(2006)报道的实验室分析方法,收集不同植物上的吡虫啉残留量,确定蜜蜂外出采集的多种花粉中的吡虫啉含量,检测到残留范围是 0.0011 ~ 0.0057 ng/μL,从向日葵中检测到吡虫啉含量范围为 0.001 ~ 0.011 ng/μL(Bonmatin *et al*., 2003),油菜中残留剂量范围为 0.023 ~ 0.03 ng(Cresswell, 2011),玉米花粉中吡虫啉残留平均浓度为 0.002 ng/μL(Charvet *et al*., 2004),综合相关报道,普遍认为吡虫啉的环境剂量范围为 0.0007 ~ 0.01 ng/μL(Cresswell, 2011)。因此,本实验中所用吡虫啉的剂量为 0.01 ng/μL。

1.3 化学药品

称量吡虫啉纯品(Sigma)溶解在丙酮溶剂中,在容量瓶中定容至 500 ng/μL,装入棕色瓶中(作为母液),在 4℃ 冰箱中保存。实验期间,取适量 500 ng/μL 母液稀释到 30%(w/v)蔗糖溶液中,最终浓度为 0.01 ng/μL。对照组溶液配制方法类似,用等量丙酮取代母液,稀释到 30%(w/v)蔗糖溶液中。为了保证每天饲喂蜜蜂的糖水保持新鲜,本实验中均为现配现用。

1.4 样本采集

从蜂场直接取 4 张健康封盖子脾,分别放入 4 个限王产卵器中,在恒温恒湿培养箱中培养(34 ± 1℃,相对湿度为 40% ± 10%,黑暗),每天取刚出房的 1 d 蜜蜂,连续取 4 d。每天取出的 1 d 蜜蜂胸部背板用不同颜色的油漆笔对蜜蜂无伤害标记,之后分别放入 4 个健康蜂箱中。将蜜蜂放入蜂箱中饲养 8 d 后取出,放入专制的饲养盒中笼养。

1.5 给药饲养

取出相同标记的工蜂,将其装入准备好的饲养盒中,每盒 50 头,并放入恒温恒湿培养箱(30 ± 1℃,相对湿度为 40% ± 10%,黑暗),将配制好的含 0.01 ng/μL 的吡虫啉丙酮溶液糖水(处理组)和只含丙酮的糖水(对照组)分别装入小型塑料饲喂器中,用蜡纸封口,并用酒精灯上烧过的针头扎几个小洞,倒置在带有纱布的饲养盒上,使得蜜蜂每天均能自由采集糖水。糖水须每天更换,保证新鲜。此外,每天记录处理组和对照组死蜂数量,并用镊子挑出死蜂。连续给药 9 d,对 18 d 工蜂进行伸吻反应(proboscis extension response, PER)实验。

1.6 PER 行为实验

1.6.1 固定蜜蜂:将蜜蜂置于特制的固定装置前(图 1),用 CO_2 气流进行麻醉,持续时间 2 s,然后转移至小玻璃瓶中,并放置在冰盒里,待蜜蜂刚冻晕后取出(冰上放置时间不宜太久)。开始固定蜜蜂,只留其头部在管外,保证吻部能自由活动。为了减小冷冻和饱食对蜜蜂行为的影响,将固定好的蜜蜂重新放入恒温恒湿培养箱(30 ± 1℃,相对湿度为 40 ± 10%,黑暗)中 2 h。

1.6.2 气味联想性学习:将恢复好的蜜蜂取到实验台,先用 50% 的蔗糖溶液触碰蜜蜂触角引发 PER(图 1),选择对蔗糖溶液有伸吻反应者作为实验对象。参考 Bitterman 等(1983)和 Sandoz 等(1995)的



图 1　50% 糖水接触到蜜蜂触角后蜜蜂的伸吻反应

Fig. 1　Proboscis extension response (PER) exhibited by a honey bee after its antennae were touched with 50% sugar water

气味联想性学习过程，进行 PER 行为试验。通过用 50% 蔗糖溶液（非条件刺激）触碰蜜蜂触角，同时给予柠檬气味（条件刺激），蜜蜂伸吻后进行糖水奖励，在柠檬气味和糖水的多次配对训练之后，蜜蜂可以对单独的柠檬气味形成 PER。每头蜜蜂一次学习行为训练时间是 6 s，首先单独柠檬气味 2 s，其次在给予柠檬气味的同时用 50% 蔗糖溶液触碰蜜蜂触角，进行糖水奖励，持续时间 2 s，最后糖水奖励 2 s。每次学习行为训练结束后，间隔 10 min，再进行下次学习行为训练，每头蜜蜂重复学习 3 次（C1，C2 和 C3）。在 C1，C2 和 C3 中，在前 2 s 只给予柠檬气味时，记录蜜蜂伸吻状况。对柠檬气味刺激表现出伸吻反应的蜜蜂，表明该蜜蜂已建立柠檬气味与 50% 蔗糖溶液之间的关联性学习，记为“ + ”，对柠檬气味刺激未表现出伸吻反应的，表明该蜜蜂未建立柠檬气味与 50% 蔗糖溶液之间的关联性学习，记为“ - ”，对照、处理各进行 4 次重复试验。

1.6.3　24 h 记忆测定：蜜蜂 3 次学习完成后，用 100 μL 移液枪饲喂蜜蜂 50% 的糖水，至饱食状态后放入恒温恒湿培养箱（30 ± 1℃，相对湿度为 40% ± 10%，黑暗）中过夜，24 h 后测定蜜蜂记忆，单独用柠檬气味对每头蜜蜂进行刺激，记录蜜蜂伸吻状况。对柠檬气味刺激表现出伸吻反应者，表明该蜜蜂对柠檬气味表现出记忆行为，记为“ + ”。对柠檬气味刺激未表现出伸吻反应者表明该蜜蜂对柠檬气味未表现出记忆行为，记为“ - ”。

1.7　统计分析

在给药过程中，每天记录处理组和对照组死蜂数，利用生存函数（SPSS 19.0）中对数秩进行统计分析；在 PER 试验期间，记录 C1，C2 和 C3 中蜜蜂对单独气味的伸吻情况，24 h 后蜜蜂对单独气味的伸吻情况，喙伸反应率（%）=（发生喙伸反应的蜜蜂数/受试蜜蜂数）× 100。4 次重复实验中 C1，C2 和 C3 中伸吻率用平均值 ± 标准误表示，并用卡方测验（SPSS 19.0）对处理组和对照组喙伸反应率（PER%）进行统计分析。

2　结果

2.1　吡虫啉对蜜蜂的毒性

给药期间，处理组与对照组均出现意大利蜜蜂个体死亡现象。利用生存函数 Kaplan-Meier 对 100 头蜜蜂（对照、处理各 50 头）在为期 9 d 饲喂过程中的生存情况进行统计分析发现，与对照组死亡率相比（图 2），处理组与对照组在给药期间，生存率无显著差异（$\chi^2 = 0.082$，$P = 0.774$），即蜜蜂在持续 9 d 自由采集含 0.01 ng/μL 吡虫啉的 30% 糖水并未引发致死毒性，田间剂量吡虫啉对蜜蜂死亡率无显著影响。

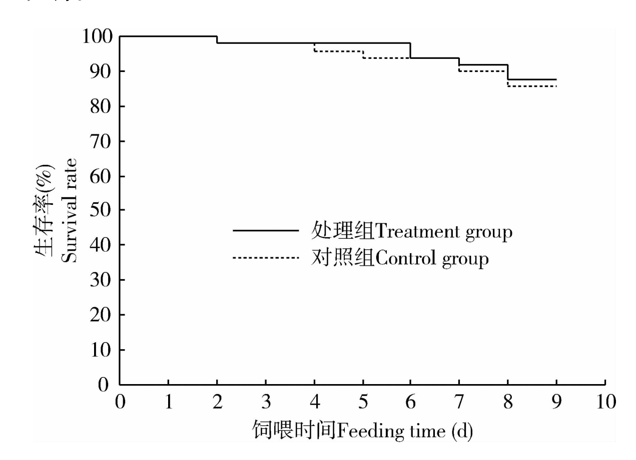


图 2　饲喂含 0.01 ng/μL 吡虫啉的 30% 糖水后意大利蜜蜂工蜂生存曲线

Fig. 2　Survival curves of *Apis mellifera ligustica* workers fed 30% (w/v) syrup containing 0.01 ng/μL imidacloprid

2.2　吡虫啉的田间剂量影响蜜蜂的学习行为

吡虫啉的田间剂量对蜜蜂的学习行为影响结果如图 3 所示，蜜蜂对条件刺激（柠檬气味）的伸吻率表示蜜蜂学习能力的高低。在 3 次学习试验中（每组实验样本个数 N = 31 ~ 43），处理组的 C2 和 C3 对单独柠檬气味表现出的伸吻率明显低于对照组，差异极显著（C2：$\chi^2 = 15.707$，$P < 0.01$；C3：χ^2 =

10.104，$P=0.001<0.01$）。从 3 次 PER 实验结果中可以看出，对照组的学习能力始终显著性地高于处理组蜜蜂，即0.01 ng/μL吡虫啉影响蜜蜂学习行为。

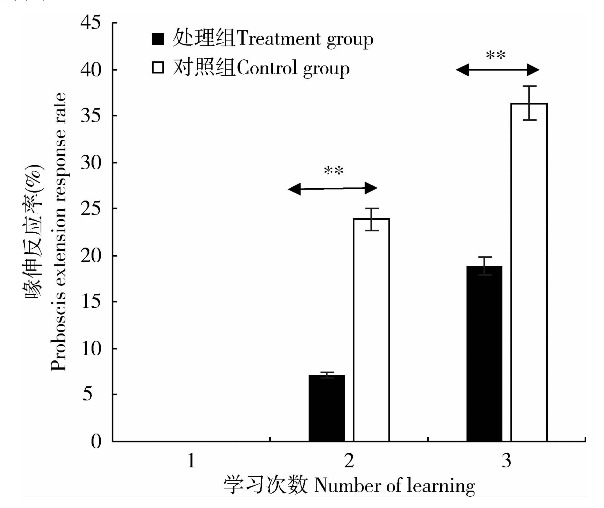


图 3 0.01 ng/μL 吡虫啉对意大利蜜蜂工蜂学习行为影响

Fig. 3 Effects of 0.01 ng/μL imidacloprid on learning behavior of *Apis mellifera ligustica* workers

** 表示在第 2、3 次学习实验中处理组与对照组喙伸反应率经 χ^2 检验差异极显著（$P<0.01$）。Double asterisk indicates that proboscis extension response rates are extremely significantly different at the 0.01 level by χ^2 test between the treatment and control groups in the 2nd and 3rd learning experiments.

2.3 吡虫啉的田间剂量影响蜜蜂的记忆行为

吡虫啉的田间剂量对蜜蜂的记忆行为影响结果如图 4 所示，学习 24 h 后，对照组和处理组蜜蜂对条件刺激（柠檬气味）的伸吻率反映蜜蜂记忆能力

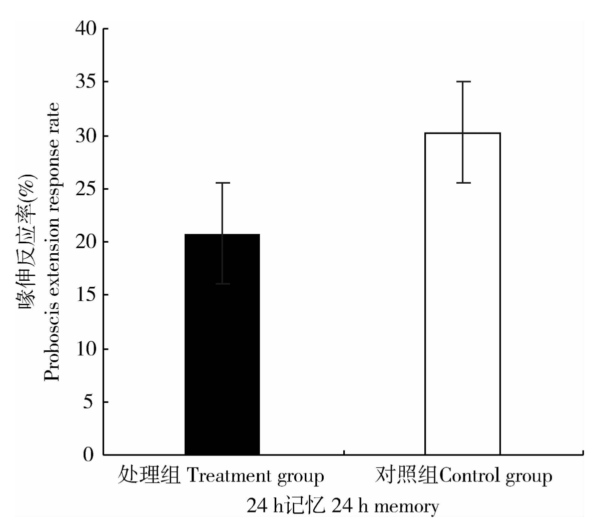


图 4 0.01 ng/μL 吡虫啉对意大利蜜蜂工蜂记忆行为的影响

Fig. 4 Effects of 0.01 ng/μL imidacloprid on memory behavior of *Apis mellifera ligustica* workers

高低。结果表明，处理组 24 h 记忆结果低于对照组，但两者之间差异不显著（$\chi^2=2.158$，$P=0.142>0.05$），表明 0.01 ng/μL 吡虫啉对蜜蜂记忆行为没有影响。

3 讨论

蜜蜂对农业生产和生态系统服务的维护均有重要价值，吡虫啉在全国使用广泛，研究其田间剂量对蜜蜂的影响尤为重要。本试验结果表明实验室条件下田间剂量的吡虫啉对意大利蜜蜂的行为毒性与多数半田间实验研究结果一致。蜜蜂持续接触 0.01 ng/μL 吡虫啉 9 d 后，对照组和处理组在死亡率上没有差异，表明 0.01 ng/μL 吡虫啉对蜜蜂没有致死毒性。而两者在学习能力差异结果表明 0.01 ng/μL 吡虫啉会对蜜蜂产生不利影响。新烟碱类农药的不利影响在蜜蜂和熊蜂中都有研究过，不利影响主要包括学习、采集和归巢能力降低。不利影响的累积，最终会对蜜蜂的生存产生威胁（Yang *et al*., 2008；Mommaerts *et al*., 2010）。本研究结果表明，吡虫啉的环境剂量对意大利蜜蜂的学习行为产生不利影响，受胁迫意蜂的学习能力显著降低，24 h 长期记忆能力不受影响。

蜜蜂的行为受到季节、基因型、日龄、营养等不同因素的影响。在本试验中，我们对刚出房的蜜蜂进行标记，在蜂群中饲养 8 d 后取出，在密闭环境中饲喂 9 d，再开展行为实验，保证了所试验的工蜂同一日龄且具有相同的营养状态，使得实验结果更为准确、可信。本试验中 0.01 ng/μL 的吡虫啉显著降低蜜蜂的学习，但不影响 24 h 长期记忆。之前 Yang 等（2012）的研究中，幼虫期接触 0.04 ng 剂量的吡虫啉对成年蜂的学习行为产生消极影响。蜜蜂幼虫期的蕈形体（MBs）、触角叶（ALs）等结构发育不完整（Farris *et al*., 1999）。幼虫期接触吡虫啉可能干预蕈形体和触角叶的发育，间接性影响成年蜂的学习行为。本研究重在探讨成蜂接触吡虫啉大田使用剂量基于直接干扰大脑机制基础上，对相同日龄蜜蜂学习、24 h 长期记忆行为的影响。许多研究表明，吡虫啉作用于蕈形体花萼水平上，花萼由许多凯尼恩细胞组成，凯尼恩细胞是蜜蜂脑部固有的神经元，蜜蜂通过口服方式接触吡虫啉后，吡虫啉与脑部乙酰胆碱受体结合。在蟑螂的电生理学研究中已经表明，吡虫啉可以消除巨大的中间神经元（Buckingham *et al*., 1997），所以推测在蜜蜂中也会

产生相似效应,蜜蜂长期接触吡虫啉过程中也导致了吡虫啉连续中断神经元信息传递,影响蜜蜂的学习行为。24 h 后,0.01 ng/μL 的吡虫啉在蜜蜂体内已代谢,所以对长期记忆没有影响,但是否影响蜜蜂的短期记忆则还需后续进一步探索。此外,触角叶与 α-脑叶中均含有与学习记忆相关的烟碱型乙酰胆碱受体,然而,吡虫啉对蜜蜂大脑的具体影响机制鲜为人知。多巴胺与章鱼胺都是与蜜蜂学习记忆相关的神经递质,学习记忆受损后,与多巴胺和章鱼胺表达相关的基因变化如何,仍需进一步深入研究。

参考文献（References）

Belzunces LP, Tchamitchian S, Brunet JL, 2012. Neural effects of insecticides in the honey bee. *Apidologie*, 43(3): 348 – 370.

Bitterman ME, Menzel R, Fietz A, Schafer S, 1983. Classical conditioning of proboscis extension in honeybees (*Apis mellifera*). *J. Comp. Psychol.*, 97(2): 107 – 119.

Bonmatin JM, Moineau I, Charvet R, Fleche C, Colin ME, Bengsch ER, 2003. A LC/APCI-MS/MS method for analysis of imidacloprid in soils, in plants, and in pollens. *Anal. Chem.*, 75(9): 2027 – 2033.

Bu YQ, Shan ZJ, Zhou JY, Lin XL, 2009. Research review on the biological toxicity and safety assessment of pesticides to honeybees. *Agrochemicals*, 48(6): 399 – 401. [卜元卿, 单正军, 周军英, 林小丽, 2009. 农药对蜜蜂生物毒性及安全性评价研究回顾. 农药, 48(6): 399 – 401]

Buckingham SD, Lapied B, Corronc HL, Grolleau F, Sattelle DB, 1997. Imidacloprid actions on insect neuronal acetylcholine receptors. *J. Exp. Biol.*, 200(21): 2685 – 2692.

Charvet R, Katouzian-Safadi M, Colin ME, Marchand PA, Bonmatin JM, 2004. Systemic insecticides: new risk for pollinator insects. *Ann. Pharm. Fr.*, 62(1): 29 – 35.

Chauzat M, Faucon J, Martel A, Lachaize J, Cougoule N, Aubert M, 2006. A survey of pesticide residues in pollen loads collected by honey bees in France. *J. Econ. Entomol.*, 99(2): 253 – 262.

Claudianos C, Ranson H, Johnson RM, Biswas S, Schuler MA, Berenbaum MR, Feyereisen R, Oakeshott JG, 2006. A deficit of detoxification enzymes: pesticide sensitivity and environmental response in the honeybee. *Insect Mol. Biol.*, 15(5): 615 – 636.

Cox-Foster DL, Conlan S, Holmes EC, Palacios G, Evans JD, Moran NA, Quan PL, Briese T, Hornig M, Geiser DM, Martinson V, vanEngelsdorp D, Kalkstein AL, Drysdale A, Hui J, Zhai JH, Cui LW, Hutchison SK, Simons JF, Egholm M, Pettis JS, Lipkin W, 2007. A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science*, 318(5848): 283 – 287.

Cresswell JE, 2011. A meta-analysis of experiments testing the effects of a neonicotinoid insecticide (imidacloprid) on honey bees. *Ecotoxicology*, 20(1): 149 – 157.

Dai PL, Zhou T, Wang Q, Wu YY, Geng WL, Song HL, 2013. Effects of imidacloprid on learning behavior of *Apis mellifera ligustica*. *Agrochemicals*, 52(7): 512 – 514. [代平礼, 周婷, 王强, 吴艳艳, 耿文龙, 宋怀磊, 2013. 吡虫啉对意大利蜜蜂学习行为的影响. 农药, 52(7): 512 – 514]

Decourtye A, Devillers J, 2010. Ecotoxicity of Neonicotinoid Insecticides to Bees. Insect Nicotinic Acetylcholine Receptors. Springer New York, NY. 85 – 95.

Decourtye A, Devillers J, Cluzeau S, Charreton M, Pham-Delegue MH, 2004. Effects of imidacloprid and deltamethrin on associative learning in honeybees under semi-field and laboratory conditions. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 57(3): 410 – 419.

Farooqui T, 2013. A potential link among biogenic amines-based pesticides, learning and memory, and colony collapse disorder: a unique hypothesis. *Neurochem. Int.*, 62(1): 122 – 136.

Farris SM, Robinson GE, Davis RL, Fahrbach SE, 1999. Larval and pupal development of the mushroom bodies in the honey bee, *Apis mellifera*. *J. Comp. Neurol.*, 414(1): 97 – 113.

Girolami V, Mazzon L, Squartini A, Mori N, Marzaro M, Bernardo AD, Greatti M, Giorio C, Tapparo A, 2009. Translocation of neonicotinoid insecticides from coated seeds to seedling guttation drops: a novel way of intoxication for bees. *J. Econ. Entomol.*, 102(5): 1808 – 1815.

Guez D, 2013. A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees: questioning the ecological relevance. *Front. Physiol.*, 4: 37 – 37.

Iwasa T, Motoyama N, Ambrose JT, Roe RM, 2004. Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis mellifera*. *Crop Prot.*, 23(5): 371 – 378.

Klein AM, Vaissiere BE, Cane JH, Steffan-Dewenter I, Cunningham SA, Kremen C, Tscharntke T, 2007. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 274(1608): 303 – 313.

Lu CS, Warchol KM, Callahan RA, 2012. In situ replication of honey bee colony collapse disorder. *Bull. Insectol.*, 65(1): 99 – 106.

Matsuda K, Buckingham SD, Kleier D, Rauh JJ, Grauso M, Sattelle DB, 2001. Neonicotinoids: insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptors. *Trends Pharmacol. Sci.*, 22(11): 573 – 580.

Mommaerts V, Reynders S, Boulet J, Besard L, Sterk G, Smagghe G, 2010. Risk assessment for side-effects of neonicotinoids against bumblebees with and without impairing foraging behavior. *Ecotoxicology*, 19(1): 207 – 215.

Morse RA, Calderone NW, 2000. The value of honey bees as pollinators of US crops in 2000. *Bee Cult.*, 128(3): 1 – 15.

Mullin CA, Frazier M, Frazier JL, Ashcraft S, Simonds R, Van Engelsdorp D, Pettis JS, 2010. High levels of miticides and agrochemicals in North American apiaries: implications for honey bee health. *PLoS ONE*, 5(3): e9754.

Nauen R, Tietjen K, Wagner K, Elbert A, 1998. Efficacy of plant metabolites of imidacloprid against *Myzus persicae* and *Aphis gossypii* (Homoptera: Aphididae). *Pestic. Sci.*, 52(1): 53 – 57.

Neumann P, Carreck NL, 2010. Honey bee colony losses. *J. Apicult. Res.*, 49(1): 1 – 6.

Oldroyd BP, 2007. What's killing American honey bees? *PLoS Biol.*, 5(6): e168.

Pettis JS, Vanengelsdorp D, Johnson J, Dively G, 2012. Pesticide exposure in honey bees results in increased levels of the gut pathogen *Nosema*. *Naturwissenschaften*, 99(2): 153 - 158.

Sandoz JC, Roger B, Phamdelègue MH, 1995. Olfactory learning and memory in the honeybee: comparison of different classical conditioning procedures of the proboscis extension response. *C. R. Acad. Sci. III*, 318(7): 749 - 755.

Schmuck R, 2004. Effects of a chronic dietary exposure of the honeybee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) to imidacloprid. *Arch. Environ. Con. Tox.*, 47(4): 471 - 478.

Schmuck R, Schoning R, Stork A, Schramel O, 2001. Risk posed to honeybees (*Apis mellifera* L, Hymenoptera) by an imidacloprid seed dressing of sunflowers. *Pest Manag. Sci.*, 57(3): 225 - 238.

Suchail S, Guez D, Belzunces LP, 2000. Characteristics of imidacloprid toxicity in two *Apis mellifera* subspecies. *Environ. Toxicol. Chem.*, 19(7): 1901 - 1905.

Suchail S, Guez D, Belzunces LP, 2001. Discrepancy between acute and chronic toxicity induced by imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 20(11): 2482 - 2486.

Suchail S, Sousa GD, Rahmani R, Belzunces LP, 2004. *In vivo* distribution and metabolisation of 14C-imidacloprid in different compartments of *Apis mellifera* L. *Pest Manag. Sci.*, 60(11): 1056 - 1062.

van der Sluijs JP, Simon-Delso N, Goulson D, Maxim L, Bonmatin JM, Belzunces LP, 2013. Neonicotinoids, bee disorders and the sustainability of pollinator services. *Curr. Opin. Env. Sust.*, 5(3): 293 - 305.

Vanengelsdorp D, Underwood R, Caron D, Jerry Hayes JR, 2007. An estimate of managed colony losses in the winter of 2006 - 2007: a report commissioned by the apiary inspectors of America. *Am. Bee J.*, 147(7): 599 - 603.

Vidau C, Diogon M, Aufauvre J, Fontbonne R, Vigues B, Brunet JL, Texier C, Biron DG, Blot N, Alaoui HE, Belzunces LP, Delbac F, 2011. Exposure to sublethal doses of fipronil and thiacloprid highly increases mortality of honeybees previously infected by *Nosema ceranae*. *PLoS ONE*, 6(6): e21550.

Wu-Smart J, Spivak M, 2016. Sub-lethal effects of dietary neonicotinoid insecticide exposure on honey bee queen fecundity and colony development. *Sci. Rep.*, 6: 32108.

Yang EC, Chang HC, Wu WY, Chen YW, 2012. Impaired olfactory associative behavior of honeybee workers due to contamination of imidacloprid in the larval stage. *PLoS ONE*, 7(11): e49472.

Yang EC, Chuang YC, Chen YL, Chang LH, 2008. Abnormal foraging behavior induced by sublethal dosage of imidacloprid in the honey bee (Hymenoptera: Apidae). *J. Econ. Entomol.*, 101(6): 1743 - 1748.

（责任编辑：赵利辉）